

## 論文の内容の要旨

論文題目 Analgesic Effects of Topical Application of Clonidine Cream in Different Pain Models of Rats

各種疼痛モデルにおけるクロニジン軟膏末梢投与による鎮痛効果の検討

指導教員 有田英子 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 李 簾 (Chi Li)

**【背景】**  $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬は心血管系、内分泌系、運動行動系、疼痛受容系など、さまざまな生体の生理的機能に影響を及ぼす。クロニジンを代表とする  $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬の鎮痛効果に関して、多数の研究報告がなされている。それによれば、 $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬は、神経因性疼痛、炎症性疼痛、術後痛を含めた種々の疼痛に対して全身投与、あるいは脊髄投与によって強力な鎮痛効果を発揮する。しかし、その際、鎮静や血圧低下などの副作用がしばしば生じるためその有用性は限られている。一方、クロニジンの軟膏製剤の鎮痛特性についてはまだ検討されていない。軟膏製剤は、疼痛部位に薬物を高濃度に投与でき、しかも全身的副作用を軽減できる利点が考えられる。そこで今回、ラットの神経因性疼痛モデル、炎症性疼痛モデル、術後痛モデルにおいてクロニジン軟膏単回投与による抗痛覚過敏効果を行動科学的、及び免疫組織化学的に検討した。また、術後痛モデルにおいてはクロニジン軟膏反復投与による抗痛覚過敏効果の行動科学的検討も行った。

**【方法】** 試験薬物として 3 種類の濃度のクロニジン軟膏 (30, 100, 300  $\mu$ g/g) を作成した。雄性 SD 系ラットを用い、以下の三つのモデルを作成した。

神経因性疼痛モデル (Chung モデル: spinal nerve ligation [SNL] モデル) 片側の L5、L6 脊髄神経を結紮することにより作成する末梢神経損傷モデルである。SNL 術後 7 日目に、クロニジン各軟膏 0.1g (クロニジンの投与量として 3, 10, 30  $\mu$ g) または基剤 0.1g を患側または健側の後肢足底に塗布した (各群 n=6)。Hargreaves box による熱刺激に対する逃避潜時、及び von Frey filaments による機械的触刺激に対する逃避閾値を、クロニジン投与前、および投与 1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、24 時間、72 時間、120 時間後に、患側及び健側足底にて測定した。別のラットにおいてクロニジン軟膏 (30  $\mu$ g) または基剤 0.1g の投与の 4 時間後に脊髄還流固定後に腰髄のスライス標本を作製し、抗 Fos 蛋白抗体を用いた免疫染色を行い、神経細胞活動の指標である脊髄後角 Fos 陽性細胞数を数えた。

炎症性疼痛モデル(カラゲニンモデル) 2%のカラゲニンをラット後肢の足底に皮下注入することにより作成する炎症性疼痛モデルである。カラゲニン皮下注入3時間後にクロニジン各軟膏0.1g(クロニジンの投与量として3, 10, 30 $\mu$ g)または基剤0.1gを患側後肢足底に塗布した(各群n=6)。Hargreaves boxによる熱刺激に対する逃避潜時、及びvon Frey filamentsによる機械的触刺激に対する逃避閾値を、クロニジン投与前、および投与1時間、2時間、4時間、6時間、24時間、72時間後に、患側及び健側足底にて測定した。別のラットにおいてクロニジン軟膏(30 $\mu$ g)または基剤0.1g投与の4時間後に脊髄還流固定後に腰髄のスライス標本を作製し、抗 Fos 蛋白抗体を用いた免疫染色を行い、脊髄後角 Fos 陽性細胞数を数えた。

術後痛モデル(Brennan 皮膚切開モデル) ラット後肢の足底に筋層まで達する皮膚切開を加え、すぐにその部位を縫合して作成する術後痛モデルである。皮膚切開手術の2時間後に、クロニジン各軟膏0.1g(クロニジンの投与量として3, 10, 30 $\mu$ g)または基剤0.1gを患側後肢に塗布した(各群n=6)。Hargreaves boxによる熱刺激に対する逃避潜時、及びvon Frey filamentsによる機械的触刺激に対する逃避閾値を、クロニジン投与前、および投与1時間、2時間、4時間、6時間、24時間、72時間後に、患側及び健側足底にて測定した。別のラットにおいてクロニジン軟膏(30 $\mu$ g)または基剤0.1gの投与4時間後に脊髄還流固定後に腰髄のスライス標本を作製し、抗 Fos 蛋白抗体を用いた免疫染色を行い、脊髄後角 Fos 陽性細胞数を数えた。

反復投与群においてはクロニジン各軟膏0.1g(クロニジンの投与量として3, 10, 30 $\mu$ g)または基剤0.1gを患側足底に塗布した(各n=6)。術当日は塗布後2、4時間時、第1病日から5病日まで毎日のクロニジン塗布の2時間後にHargreaves boxにて熱刺激に対する逃避潜時及びvon Frey テストでの機械的触刺激に対する逃避閾値を患側及び健側足底にて測定した。

以上の疼痛モデルにおいてクロニジン軟膏投与の鎮痛効果が認められた場合は、 $\alpha_2$  アドレナリン受容体拮抗薬のヨヒンビンによる拮抗試験を施行した。統計処理はANOVA 及びBonferroni/Dunn 検定を使用し、 $P<0.05$ を有意とした。

**【結果】**各モデル作成後には、患側足底における逃避潜時と逃避閾値が著明に減少し、熱性刺激および機械的刺激に対する痛覚過敏の発生が示された。

神経因性モデルの患側足底においては、クロニジン軟膏単回投与後、用量依存性に逃避潜時及び逃避閾値が上昇し、クロニジン軟膏の、投与4-6時間をピークとする用量依存性の抗痛覚過敏効果が示された。健側足底においてはクロニジンの鎮痛効果は認められなかった。健側足底へのクロニジン軟膏単回投与後には、患側での有意な抗痛覚過敏効果は認め

られなかった。ヨヒンビン前処置によって、患側投与によるクロニジン軟膏の抗痛覚過敏効果は拮抗された。神経因性疼痛モデルにおいては、対象群に比してクロニジン群で脊髄後角 Fos 陽性細胞数が有意に減少した。層別検討では脊髄後角 V-VI 層での Fos 陽性細胞数の減少が顕著だった。

炎症性疼痛モデル、および術後痛モデルの患側足底においてはクロニジン軟膏単回投与による有意な抗痛覚過敏効果、Fos陽性細胞数の減少効果とも認められなかった。しかし、術後痛モデルでのクロニジン軟膏反復投与においては、手術の翌日から熱刺激テストにおいて用量依存性の有意な逃避潜時延長を認めた。ヨヒンビン前処置でその効果は拮抗された。機械的触刺激に対する逃避閾値の有意な上昇は認められなかった。

**【考察】** 炎症性疼痛および術後痛モデルの患側足底においてはクロニジン軟膏の単回投与による有意な抗痛覚過敏効果および脊髄後角 Fos 陽性細胞数の減少効果は認められなかったが、神経因性疼痛モデルにおいてはクロニジン軟膏の患側単回投与により有意な抗痛覚過敏効果が認められ、それに一致する形で脊髄後角 Fos 陽性細胞数の有意な減少が認められた。

この神経因性疼痛モデルにおける鎮痛効果は、軟膏塗布局所においてのみ認められ、また、患部以外への軟膏投与では有意な抗痛覚過敏効果が認められなかったことから、血中への軟膏吸収による全身的效果でなく、局所的な効果と考えられた。また、 $\alpha_2$ アドレナリン受容体拮抗薬のヨヒンビンによって拮抗されたことから、 $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した効果であると考えられた。以上を総合すると、神経因性疼痛モデルにおいてクロニジン軟膏の患側単回投与によって認められた抗痛覚過敏効果は、末梢神経の $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した局所的鎮痛効果であると考えられた。

神経因性疼痛においてのみクロニジン軟膏単回投与の鎮痛効果が発揮されたことは、神経因性疼痛において $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬の鎮痛効果が増強されるという過去の報告に合致するかもしれない。すなわち、神経損傷後の神経の変化によってクロニジンの効果が増したために、神経因性疼痛においてのみクロニジン軟膏単回投与の鎮痛効果が発揮された可能性が考えられた。ただし、痛覚過敏の程度や脊髄Fos細胞数から判断すると、クロニジン単回投与時の疼痛は、炎症性疼痛や術後痛の方が神経因性疼痛よりも強かった可能性が考えられ、そのために炎症性疼痛や術後痛においてクロニジン軟膏単回投与が無効であった可能性も考えられる。実際、術後痛に対する反復投与において、術後痛の自然軽快とともに部分的ながらクロニジン軟膏の抗痛覚過敏効果が出現し始めた。

神経因性疼痛は、オピオイドや非ステロイド性消炎鎮痛薬など通常の鎮痛薬が効果を発揮しがたい難治性疼痛であることはよく知られている。今回の研究から、そのような難治性疼痛に対しクロニジンの軟膏の塗布が副作用無く有意な鎮痛効果を発揮する可能性が示唆され、今後の臨床使用において高い有用性が期待できると考えられた。

**【結論】** ラットの神経因性疼痛モデルにおいて、クロニジン軟膏の患側足底への単回投与により、有意な抗痛覚過敏効果が認められた。この効果は末梢神経の $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した局所的鎮痛効果であると考えられた。今回の実験結果から、クロニジン軟膏の神経因性神経因性疼痛への臨床応用が期待される。